



(19) **RU** (11) **2 078 769** (13) **C1**
 (51) МПК⁶ **C 07 K 7/06, 14/62, A 61 K**
38/28

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
 ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

(21), (22) Заявка: 95114858/04, 18.08.1995

(46) Дата публикации: 10.05.1997

(56) Ссылки: 1. G. Weitzel and coworkers, Hoppe - Seyler S. Z. Physiol. Chem. 1971, V. 352, p. 1005 2. G. Weitzel and coworkers, "Further studies on biologically active synthetic fragments of the B-chain" Hoppe - Seyler S. Z. Physiol. Chem. 1973, V. 354, p. 321-330 3. K. Kikuchi and coworkers "Studies on the biological activity of degraded insulins and insulin fragments" J. Biol. Chem. 1980, V. 255, N 19, p. 9281-9288

(71) Заявитель:

Научно-исследовательский институт
 биомедицинской химии РАМН

(72) Изобретатель: Дюмаев К.М.,

Княжев В.А., Арчаков А.И., Прозоровский
 В.Н., Ипатова О.М., Гусева М.К., Алексеева
 А.Е., Гребенщикова О.Г., Максимова
 Е.М., Куценко Н.Г.

(73) Патентообладатель:

Научно-исследовательский институт
 биомедицинской химии РАМН

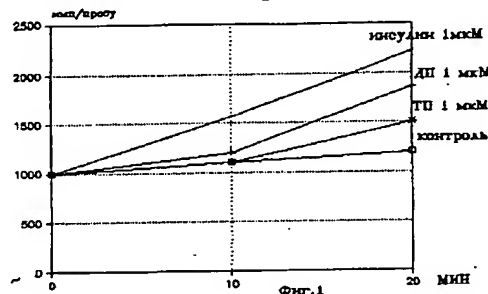
(54) ПЕПТИДНЫЙ ФРАГМЕНТ, ОБЛАДАЮЩИЙ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ ИНСУЛИНА

(57) Реферат:

Использование: в медицинской биохимии.
 Сущность: продукт декапептидный фрагмент формулы

HOOC-Asn-Cys-S-S-Cys-Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-COOH, обладающий биологической активностью инсулина. Реагент 1: дипептид Cys-Asn, реагент 2: октапептид Cys-Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr. Условия реакции: синтез проводят на пептидном синтезаторе Applied Biosystems 431A дициклокарбодиимидным методом в присутствии 1-гидроксibenзотриазола с использованием

9-флуоренилметоксикарбонил-(Fmoc)-защищенных аминокислот. Выход 20 %. 3 ил.



RU 2 078 769 C1

RU 2 078 769 C1



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 078 769** ⁽¹³⁾ **C1**
(51) Int. Cl.⁶ **C 07 K 7/06, 14/62, A 61 K**
38/28

RUSSIAN AGENCY
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: 95114858/04, 18.08.1995

(46) Date of publication: 10.05.1997

(71) Applicant:
Nauchno-issledovatel'skij institut
biomeditsinskoj khimii RAMN

(72) Inventor: Djumaev K.M.,
Knjazhev V.A., Archakov A.I., Prozorovskij
V.N., Ipatova O.M., Guseva M.K., Alekseeva
A.E., Grebenshchikova O.G., Maksimova
E.M., Kutsenko N.G.

(73) Proprietor:
Nauchno-issledovatel'skij institut
biomeditsinskoj khimii RAMN

(54) **PEPTIDE FRAGMENT SHOWING BIOLOGICAL ACTIVITY OF INSULIN**

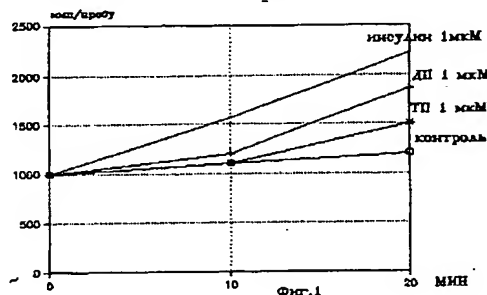
(57) Abstract:

FIELD: medicinal biochemistry,
endocrinology. SUBSTANCE: product:
decapeptide fragment of the formula:
HOOC-Asn-Cys-

-S-S-Cys-Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-COOH
showing biological activity of insulin.
Reagent 1: dipeptide: Cys-Asn. Reagent 2:
octapeptide:

Cys-Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr. Reaction
conditions: synthesis is carried out in
peptide synthesizer by dicyclocarbodiimide
method in the presence of
1-hydroxybenzotriazole and using
9-fluorenylmethoxycarbonyl-(Fmoc)-protected

amino acids. Yield is 20%. EFFECT: improved
method of synthesis, increased yield. 3 dwg



RU 2 078 769 C1

RU 2 078 769 C1

Изобретение относится к медицинской биохимии, в частности к новому фрагменту, обладающему биологической активностью инсулина.

Согласно современному уровню знаний для проявления биологической активности аналоги инсулина должны обладать определенными структурными и химическими свойствами.

Установлено, что наличие остатка аргинина В22 необходимо для проявления активности инсулина. С другой стороны, укороченные пептидные аналоги В-цепи инсулина, содержащие аргинин В22, но не содержащие ароматических аминокислот В24-В26, после комбинации с природной А-цепью инсулина проявляют слабую активность [1]

Известен ряд пептидных фрагментов, не являющихся структурными аналогами инсулина, которые проявляют остаточную биологическую активность инсулина *in vivo* и *in vitro*.

Так синтетические пептидные фрагменты Arg-Gly-Phe-NH₂ и

Arg-Gly-Phe-Phe-NH₂ проявляют слабую биологическую активность *in vivo* и *in vitro* по сравнению с активностью инсулина [2]

Известен также малоактивный пентапептидный фрагмент В22-26 Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr В-цепи инсулина, содержащий активный центр молекулы. Этот гидрофобный участок на С-конце В-цепи молекулы инсулина является важнейшей областью, ответственной за связывание с рецептором, биологическую активность, образование димеров [3]

Известны дезоктапептид В-цепи инсулина и дезаспаргин А-цепи инсулина, обладающие утраченной в значительной степени биологической активностью и являющиеся фрагментами протеолитической деградации молекулы инсулина [4]

Известно, что С-концевой участок А-цепи инсулина А20-21 (Cys-Asn) также чрезвычайно важен для проявления инсулином биологической активности. Так дезаспаргин инсулин обладает слабой активностью, менее 4 активности нативного гормона (Ying-Chi Chu and Coworkers. Biochemistry. 1987, v. 26, p. 6966-6971).

Анализ данных об аминокислотных остатках, непосредственно участвующих и ответственных за связывание с рецептором и проявление биологической активности инсулина, приводит к выводу, что район связывания с рецептором сформирован на С-концевых участках В- и А-цепи инсулина (Kirsten Drejer. Diabetes/Metabolism Reviews. 1992, vol. 8, p. 259-286).

Примененный метод компьютерного моделирования пространственной структуры молекулы инсулина, анализ локализации аминокислотных остатков, ответственных за связывание с рецептором, показал, что все они пространственно сближены между собой и формируют область активного центра инсулина, ответственную за связывание с рецептором и проявление биологической активности. Эта область непосредственно сформирована аминокислотными остатками В-цепи (19-26) и А-цепи (20-21). Сближенность в пространстве участков А20-21 и В19-26 обусловлена наличием дисульфидной связи между цистеинами в

позициях В19 и А20.

Задача изобретения поиск и создание биологически активного пептидного аналога инсулина на основе обобщенных данных в этой области.

5 Поставленная задача решена тем, что синтезирован новый пептидный фрагмент общей формулы
 10 HOOC-Asn-Cys-S-S-Cys-Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-COOH, непосредственно ответственный за связывание гормона с рецептором и обладающий сравнимой с нативным гормоном биологической активностью при использовании одинаковых концентраций для биологического тестирования.

15 Предлагаемый декапептидный фрагмент инсулина (ДП) и его свойства в литературе не описаны.

Предложенный ДП состоит из двух пептидов (дипептид и октапептид, составляющие вместе центр связывания с рецептором), связанных между собой и структурно застabilизированных дисульфидной связью.

20 Основные преимущества в получении ДП связаны с использованием стандартных методов твердофазного синтеза на автоматической аппаратуре, создающих условия снятия со смолы пептидов и боковых защитных групп, высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) для очистки пептидов.

30 Для получения предлагаемого пептидного фрагмента предварительно проводят синтез его составляющих: дипептида (Cys-Asn) и октапептида

35 (Cys-Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr). Синтез проводят на пептидном синтезаторе Applied Biosystems 431A дициклокарбодиимидным методом в присутствии 1-гидроксисбензотриазола с использованием 9-флуоренилметокси-карбонил-(Fmoc)-защитных аминокислот.

40 В качестве твердой фазы для синтеза октапептида используют смолу p-Benzyloxybenzyl Alcohol Resin (Novabiochem). Синтез дипептида проводят с использованием смолы Fmoc-Asn-(Mbh)Resin (Novabiochem), где

45 Mbh-4,4-диметилоксибензгидрил. Снятие пептидов со смолы также, как и снятие всех боковых групп, кроме ацетамидометил-(Асм) защитной группы цистеина, проводят инкубацией в течение 4 ч в атмосфере азота в следующей смеси, трифторуксусная кислота (ТФУ) 90; тионизол 5; этандитиол 3, анизол 2.

50 Полученные пептиды очищают от избытка реагентов методом ВЭЖХ с помощью градиентного элюирования ацетонитрилом в 0,1-ной ТФУ на колонке диасорб 130 С-16/Г, фракции с пептидным материалом лиофилизируют.

55 Пример конкретного получения фрагмента инсулина ДП.

Образование дисульфидной связи между дипептидом и октапептидом проводят следующим образом.

60 Дипептид и октапептид (по 10 мМ), содержащие Асм-защитные группы цистеина, растворяют в 70 мл смеси метанола и воды (1:6) при комнатной температуре. К полученному раствору постепенно, в течение 75 мин при постоянном перемешивании добавляют 10 мл 2 мМ-ного раствора йода в метаноле. Раствор

охлаждают до 0°C и добавляют 1 М раствор тиосульфата натрия до исчезновения желтого окрашивания, затем добавляют избыток тиосульфата натрия. Метанол отгоняют на роторном испарителе, водную фракцию с пептидным материалом лиофилизируют.

Полученный лиофилизат, содержащий смесь пептидов в пептидный фрагмент ДП, растворяют в 30-ной уксусной кислоте и после удаления нерастворимого осадка разделяют методом ВЭЖХ на колонке Ultrapack ODS-120 с помощью градиентного элюирования ацетонитрилом в 0,1-ной ТФУ на протяжении 60 мин при скорости элюции 1мл/мин. Детектирование при 214 и 254 нм. Собирают три пептидосодержащие фракции: фракция 1 (время удержания 40 мин) содержит 57 материала, фракция 2 (время удержания 44 мин) 20 а фракция 3 (время удержания 48 мин) 23 Собранный материал высушивают по фракциям и сохраняют при 4°C.

Материал фракции 1 при рехроматографии методом ВЭЖХ в тех же условиях дает единственный пик с временем удержания 40 мин и поглощением в ультрафиолете при 254 нм (за счет остатка тирозина) и 214 нм (за счет пептидной связи).

Аминокислотный анализ: Asp 1,0 (1), Glu 1,3 (1), Gly 2,2 (2), Tyr 0,85 (1), Phe 1,9 (2), Arg 1,1 (1), Cus не определяли.

Результаты анализа аминокислотного состава фракции 1 (состав соответствует заданной для синтеза структуре), присутствие единственного пептидного пика при использовании метода ВЭЖХ с соответствующими спектральными данными, после окончательной очистки (рехроматография) свидетельствует о соответствии синтезированного материала предлагаемому фрагменту инсулина, состоящему из двух пептидов (дипептид Cys-Asn и октапептид Cys-Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr), соединенных между собой дисульфидной связью. Выход целевого пептидного фрагмента ДП в расчете на исходный октапептид составляет 20

Проведены биохимические исследования предложенного пептидного фрагмента инсулина ДП.

На фиг. 1 представлен график влияния инсулина и пептидов на синтез гликогена в адипоцитах; на фиг. 2 график влияния инсулина и пептидов на поглощение [С-14]-глюкозы клетками L-929; на фиг. 3 график влияния инсулина и/или ДП на биосинтез ДНК.

Реактивы: инсулин (активность 40 ед./мл, 0,13 ед. 0,83 нмоль), Россия; [С-14] глюкоза (специфическая активность 1500 ГБк/моль), "Изотоп", Россия; [С-14] тимидин (специфическая активность 1850 ГБк/моль), "Изотоп", Россия.

Отличительные особенности и преимущества предлагаемого ДП станут понятными из приведенных ниже примеров.

Пример 1. Влияние инсулина и инсулиновых пептидов ДП и тетрапептида (ТП), представляющего собой инсулиновый фрагмент В(22-25) Arg-Gly-Phe-Phe (Biologically active peptides, Novabiochem, коммерческий препарат), на биосинтез гликогена в адипоцитах крыс.

Адипоциты, полученные из эпидидимальной жировой ткани крыс,

инкубируют при 37°C с 0,5 мкКи [С-14]-глюкозы в среде, содержащей инсулин, ДП или ТП (контрольные адипоциты не содержат ростовых факторов). Через 10 и 20 мин инкубации определяют количество радиоактивности в гликогене. Обнаружено, что ДП и ТП обладают способностью увеличивать (хотя и в меньшей степени, чем инсулин) скорость включения [С-14] -глюкозы в гликоген адипоцитов крыс, причем количество включившейся за 20 мин [С-14]-глюкозы для инсулина, ДП и ТП составляет соответственно 185, 155, 125 по отношению к контролю (см. фиг. 1).

Пример 2. Сравнительное исследование влияния инсулина и инсулиновых пептидов ДП и ТП на поглощение [С-14]-глюкозы культивируемыми клетками L-929 (фибробластоподобные клетки фибросаркомы мышей).

Клетки, находящиеся в состоянии конфлюэнта, в течение суток культивируют в глюкозодефицитной среде, после чего в среду вносят инсулин или инсулиновые пептиды (ДП, ТП) в концентрации 0,01-2 мкМ, инкубируют в течение 3 ч, затем добавляя 0,5 мкКи/мл [С-14] -глюкозы. Через 10 мин инкубации с меченой глюкозой определяют количество поглощенной клетками радиоактивности. Показано, что оба инсулиновых пептида стимулируют поглощение [С-14]-глюкозы, однако ДП значительно активнее, чем ТП. В концентрации 0,1 мкМ ТП не влияет на поглощение глюкозы, а ДП стимулирует поглощение на 180 по сравнению с контролем. В концентрации 1 мкМ ТП стимулирует поглощение [С-14]-глюкозы примерно на 150 а ДП на 305 В концентрации 2 мкМ ТП стимулирует поглощение [С-14]-глюкозы на 200 а ДП на 360 (см. фиг. 2).

Пример 3. Конкурентные взаимоотношения инсулина и ДП показаны на примере влияния инсулина и ДП на биосинтез ДНК (по включению [С-14]-тимидина в клетки, определяемому по методу Rotella C.M et al. Horm. Metab. Res. 981, v.13, p. 565 569).

Перед экспериментом субконфлюэнтные культуры синхронизируют в среде 199, содержащей 0,5 сыворотки, в течение 48 ч с ежедневной сменой среды. После этого среду меняют на бессывороточную среду с различными дозами инсулина или ДП. Через 21 ч добавляют [С-14]-тимидин (5 мкКи/мл) и инкубируют при 37°C в течение 4 ч. Реакцию останавливают, помещая клетки в лед, промывают холодным фосфатным буфером (или средой Хенкса). Клетки фиксируют в смеси спирта и уксусной кислоты (9:1) лизируют 0,3 н. КОН и радиоактивность лизата считают в жидкости Брея в сцинтилляционном счетчике. Обнаружено, что при добавлении к клеткам инсулина в концентрации 0,05 и 0,1 мкМ биосинтез ДНК возрастает и составляет соответственно 160 и 220 по сравнению с контролем. ДП в концентрации 0,1 и 1 мкМ усиливает биосинтез ДНК соответственно на 120 и 145 Совместное добавление инсулина и ДП вызывает такое же усиление синтеза ДНК, что и добавление одного инсулина (см. фиг.3).

Предложенный пептидный фрагмент, обладающий биологической активностью, сравнимой с активностью инсулина, может найти применение в медицине как основа для

разработки в дальнейшем лекарственной формы пептидного препарата, используемого при терапии инсулинозависимого диабета, а также в фундаментальных научных исследованиях механизмов молекулярного узнавания (гормон-рецептор).

Формула изобретения:

Пептидный фрагмент формулы HOOC
 $\text{Asn- Cys S S -Cys-Gly -}$
 $\text{Gly-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-COOH}$, обладающий биологической активностью инсулина.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

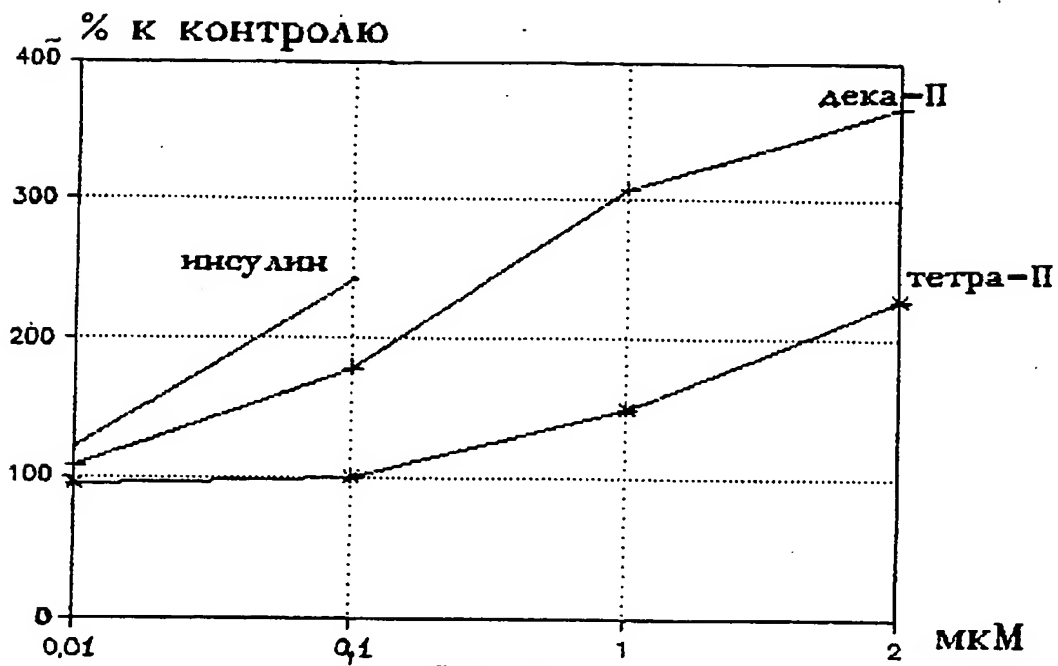
55

60

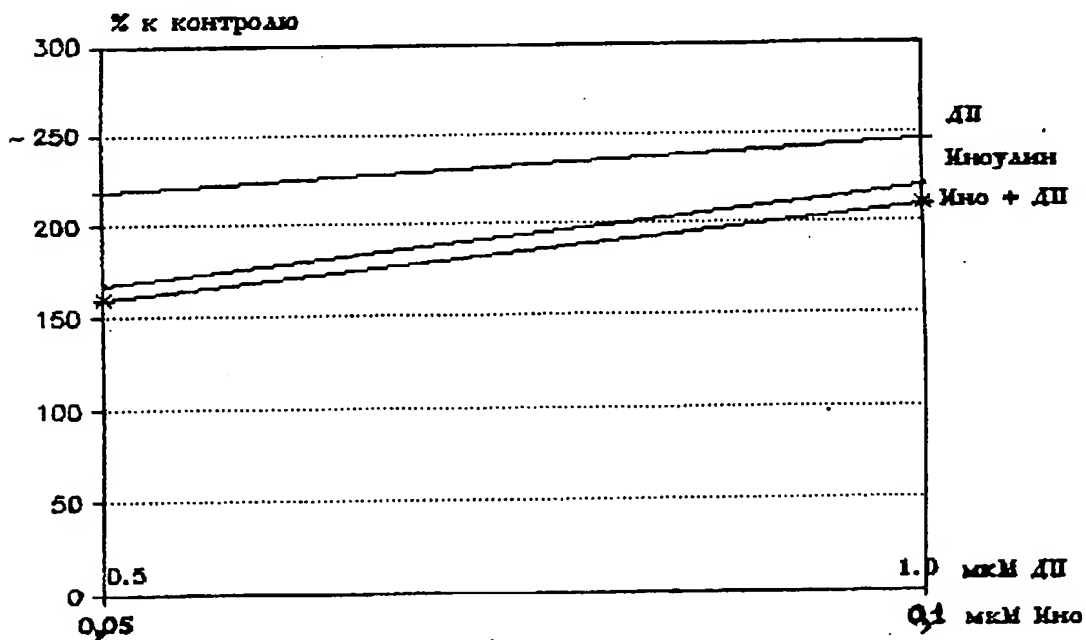
-5-

RU 2078769 C1

RU 2078769 C1



Фиг.2



Фиг.3

* * * * * STN Karlsruhe * * * * *
FILE 'HOME' ENTERED AT 14:09:37 ON 24 AUG 2006

=> file caplus

=> s ru2078769/pn
L1 1 RU2078769/PN

=> d gi,ab

L1 ANSWER 1 OF 1 CAPLUS COPYRIGHT 2006 ACS on STN
AB Title only translated.

=> file wpindex

=> s ru2078769/pn
L2 1 RU2078769/PN

=> d ti,pa,gi,ab

L2 ANSWER 1 OF 1 WPINDEX COPYRIGHT 2006 THE THOMSON CORP on STN
TI New peptide fragment having insulin activity - useful for treating diabetes or for
studying insulin receptor function.
PA (AMBI-R) A MED BIOMED CHEM RES INST
AB RU 2078769 C UPAB: 19971125
The peptide fragment of formula (I) having biological activity comparable to that of insulin
is new: HOOC-Asn-Cys-S-S-Cys-Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-COOH (I).
Note: In the claim, the sequence is given as HOOC-Asn-Cys-S-S-Cys-Gly-Gly-Arg- Gly-Phe-Phe-
Tyr-COOH.
USE - The new peptide has biological activity comparable to that of native hormone insulin and
will be useful in biochemistry and medicine. For example, the peptide can be used in a
medicinal preparation for treatment of insulin diabetes and in studies of molecular hormone-
receptor mechanism. Dwg.0/3

---Logging off of STN---

FULL ESTIMATED COST 7,83 11,72

STN INTERNATIONAL LOGOFF AT 14:11:01 ON 24 AUG 2006